

## Kutatási beszámoló

Pályázatunk célja annak kiderítése volt, hogy az agyi asztrociták mutatnak-e nemi különbségeket, akár struktúra, akár területi megoszlás, akár reaktivitás tekintetében. Alkalmazott megközelítésünk elsősorban funkcionális morfológiai volt, ezen belül is központi szerepet kapott az asztroglia specifikus meghatározó struktúrfehérjéje, a GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) immunhisztokémiai vizsgálata. Ez a fehérje nemcsak integrális eleme az asztroglia sejtvázáknak, hanem igen érzékenyen reagál az asztroglit érő behatásokra. Ezek a hatások származhatnak magából a szervezetből, de lehetnek külső forrásból eredőek is. A GFAP reakció változásai számot adhatnak az asztrociták aktuális funkcionális állapotáról.

-----

Céljainknak megfelelően, alap módszerekként a következőket alkalmaztuk:

- Immunhisztokémia.

Zamboni oldattal történt perfúzióval fixált patkány agy vibratómmal készített sorozatmetszetein GFAP ellen termelt monoklonális antiszérummal immunfestés végeztünk, diaminobenzidin (DAB) és DAB-nikkel kromogén használatával.

- Elektronmikroszkópia

Egyes immunfestett mikrorégiókat a fénymikroszkópos vizsgálat alapján epoxi műgyantába ágyztuk, és belőlük ultramikrotómmal metszeteket készítettünk elektronmikroszkópos vizsgálat céljára. Egyes esetekben az immunreakciót már eleve ultravékony metszeten végeztük el (postembedding-technika).

- Felületi denzitometria

Mivel az immunhisztokémiai festések a 40-60 mikron vastag vibratóm metszeteknek csak a felületi 5-10 mikronos rétegében találhatók, az ebben a fókuszmélység-tartományban készített képek digitalizálás útján alkalmassá tehetők számítógépes megjelenítésre. A reakciók erősségét ún. szürkesség-skálán (grayscale) objektív módon lehet értékelni, amennyiben a szürkesség értékekhez megfelelő pixel-szám rendelhető (lefedettség). Ez lehetőséget biztosít az immunfestés erősségének kvantitatív értékelésére.

..- Biokémia

Néhány esetben, egyes kiválasztott, a megítélés szempontjából fontosnak tartott régióban elvégeztük a GFAP meghatározást immunoblot módszer segítségével.

-----

A nemi különbségek vizsgálatáról lévén szó, elsődleges volt a nemi hormonok, mint belső környezetbeli különbségeket létrehozó tényezők szerepének tisztázása.

Az általunk feltett kérdés az volt, hogy a teljes agyra vonatkoztatottan találhatók-e különbségek a GFAP immunreaktivitásában hím és nőstény között? Az első kísérletek azt a benyomást keltették, hogy hímekben a reakció általában erősebb. A további elemzés azonban kimutatta, hogy ez csupán a statisztikai átlag, ami nőstényben erős szélsőségeket takar. Kézenfekvő volt ezeket a fluktuációkat a nőstény szexuális ciklus fázisaival összefüggésbe hozni.

Saját korábbi munkáinkból valamint számos irodalmi adatról ismert volt, hogy az „endokrin agynak” nevezett területen, mely alatt a hipotalamusz endokrin működéseket szabályozó központjai (mediobazális hipotalamusz, valamint a nagysejtes neuroszekréciós magok) és az azokkal direkt kapcsolatban lévő agyterületek (preoptikus area, elülső hipotalamikus area stb.) értendők, mind a szinaptikus plaszticitás, mind a glia reaktivitása tekintetében ciklus-függő különbségek figyelhetők meg. Mivel kérdésfeltevésünk ennél általánosabb jellegű volt – mai ismereteink fényében már szinte természetesnek tűnik, hogy az endokrin szabályozásban érintett agyterületek specifikus receptoraik révén erősen hormonérzékenyek – olyan agyi régiót kerestünk modellként, mely a fenti tulajdonságokkal nem rendelkezik, és a hormonális regulációban nem vesz részt. Vizsgálataink első szakaszában figyelmünk azért irányult a középagyban található nucleus interpeduncularis-ra, mert ez a jól körülírt, páratlan, középvonali mag a fenti kritériumoknak megfelel, ráadásul, ahogy azt korábbi GFAP térképeink jelezték, igen erős, szinte kiemelkedő GFAP immunreaktivitással rendelkezik. A nucleus interpeduncularis feltűnően erős GFAP immunreaktivitását számos irodalmi adat is megerősíti. Ezért úgy véltük, hogy ha ebben a szexuálisan semleges magban bármilyen nemi hormon hatásra bekövetkező változást észlelünk, az mindenképpen közvetlen, nem receptor mediált hatásként értékelhető.

Először intakt hím patkányokban vizsgáltuk meg részletesen a nucleus interpeduncularis szubdivízióit GFAP immunreaktivitásuk szempontjából. Megállapítottuk, a mag rostro-caudalis kiterjedésében egyformán megfigyelhető egy, az átlátnosan erős reakcióhoz képest is erősebben immunfestett külső, köpenyszerű terület, mely egy valamivel gyengébben (de az egyéb agyterületekhez képest még így is erős festődésűnek bizonyuló) központi részt vesz körül. Ezután kasztrált hímekben vizsgáltuk meg ugyanezeket az agyterületeket. megállapítottuk, hogy négy héttel a kasztráció után a nucleus interpeduncularis GFAP immunfestése szignifikánsan csökkent, különösen a mag központi részében, ahol a festés majdnem teljesen eltűnt. Tesztoszteron alkalmazásával, akár injekciók, akár beültetett

kapszula segítségével történt, csak részleges restitúciót tudtunk elérni. A tesztoszteron szubsztitúció a kasztrálás követő négy hónapig csökkenő mértékben ugyan, de kivédte a GFAP csökkenést. Négy hónap után kezelés hatástalannak bizonyult. A tesztoszteron kezelés leghosszabb időtartama hat hónap volt.

Vizsgálatainkban kezdettől igen nagy gondot fordítottunk arra, hogy mindig egymásnak pontosan megfelelő metszeteket hasonlítsunk össze. A nucleus interpeduncularis esetében ehhez nagy segítséget nyújtott a mag periferiáján észlelhető jellegzetes kapilláris szerkezet. Úgy találtuk, hogy a mag rostrocaudalis kiterjedésének közepén, kétoldalt egy-egy függőleges irányban futó hullámos kapilláris található, melynek átmetszett hurkai a preparátumokban jól azonosítható lumen-sorokat alkotnak. Noha vizsgálataink nem irányultak a perikapilláris asztrociták GFAP reakciójára, mintegy mellékes észleletként rögzítettük, hogy a fenti, hím patkányokra vonatkozó változások közepette, a perikapilláris glia, hormonális státusztól függetlenül, egyenletesen erős festődést mutatott.

A nucleus interpeduncularis nőstényekben végzett vizsgálatánál tekintettel kellett lennünk a nemi ciklus fázisaira. Reggeli hüvelykenetezéssel meghatároztuk a nőstény patkányok ciklus-állapotát, és feldolgozásukat ennek megfelelően végeztük. Rá kellett jönnünk azonban, hogy az immunfestés, mint módszer hatékonyabbnak bizonyul kérdéseink megválaszolására, ha csak a ciklus két szélsőségét, a proösztrosz-ösztroszt (magas ösztrogén szint) és a metösztroszt (alacsonyabb ösztrogén szint) vizsgáljuk. A köztes fázisok, noha vér hormon szint meghatározással, csakúgy mint hüvelykenetezéssel jól behatárolhatók, GFAP immunfestés tekintetében nehezen értékelhető átmeneti képeket adtak.

Nőstény patkányok nucleus interpeduncularisában végzett GFAP immunfestéseink azt mutatták, hogy ösztrosz idején az asztroglia immunreaktivitása szignifikánsan csökken, míg metösztroszban emelkedik. Ovariectomia hatására az intakt híméhez hasonlóan erős reakció mutatkozott, míg ösztrogén kezelés, legalábbis hat hónapos időtartamon belül, nem állította vissza az intakt nőstényekben észlelhető állapotot. Megjegyzendő ezenfelül, hogy a fentemlített perikapilláris nasztroglia nőstényben is ugyanúgy rezisztens volt akár természetes (nemi ciklus), akár mesterségesen előidézett a hormonális állapot (ovariectomia, szubsztitúciós hormon kezelés) változásokra.

Ha munkánk ezen szakaszát értékeljük, egy sajátos paradoxon mutatkozik: míg hímeiben a nemi hormon-szint csökkenése (kasztráció) asztroglia aktivitás csökkenést eredményezett a nucleus interpeduncularisban, nőstényekben ez a csökkenés éppen hogy a magas nemi hormon-szint állapotában (proösztrosz-ösztrosz) volt megfigyelhető. A gonadektómia nőstényben fokozta a GFAP immunreaktivitást. Ugyanakkor figyelemreméltó a perikapillári

asztrocita nyúlványok nemi hormon rezisztenciája mindkét nem esetében. Ebből arra következtettünk, hogy a GFAP immunfestéssel jelzett asztrocita reakció valami módon összefüggésben állhat a nemi hormonok által kiváltott neuronális, elsősorban szinaptikus változásokkal, másszóval ilyen jellegű neuronális változásokra utalhatnak. Ezt látszott alátámasztani a neuropil-től független perikapilláris glia változatlansága.

A kutatási időszak derekán módunk nyílt egy amerikai kollaboráció keretében a nucleus interpeduncularis különböző szubdivízióiban megvizsgálni az ösztrogén receptorok jelenlétét. Ebből kiderült, hogy míg hímekben ez nem fordul elő, addig nőstényben a béta ösztrogén receptor megtalálható a mag egyes területein. Ez a különbség talán magyarázatul szolgálhat az asztroglia fentemlített paradox reakciójára. Ezen a téren további vizsgálatok vannak folyamatban jórészt külső kollaborációban, de a pályázatban foglalt kérdést, nevezetesen az asztroglia szexuális dimorfizmusát egyéb, szexuálisan semlegesnek gondolt agyterületekben kívántuk tovább vizsgálni.

Mivel az előbb leírtakból nagy valószínűséggel következett, hogy az asztroglia változásai mögött nemi hormon-indukált neuronális plaszticitás áll, választásunk egy olyan rendszerre esett, mely mind idegpályák által közvetített külső hatások, mind belső reguláció alatt áll. Ez a rendszer a biológiai óra mechanizmust koordináló agyi struktúrák rendszere volt. Ennek központja a hipotalamuszban található nucleus suprachiasmaticus. Ez a mag közvetlen rostokat kap a retinától (retinohipotalamikus pálya), a corpus geniculatum laterale-től, mely által közvetetten is jut hozzá a retinális inger, továbbá kapcsolatban áll az agytörzs némely peptiderg rendszerével.

A nucleus suprachiasmaticus GFAP reakcióját, a korábbi vizsgálati sémánkhoz hasonlóan először hím patkányokban vizsgáltuk, abból a megfontolásból, hogy ezekben a nemi hormonszint természetes fluktuációjával nem kell számolnunk. Tekintettel arra az ismert tényre, hogy a biológiai folyamatok endogén napi ritmicitással rendelkeznek, melyet a világos-sötét napi ciklusok is befolyásolnak, kísérleti állataink nagyobbik csoportját tizenkét órás világos-sötét periódusok alatt tartottuk, mégpedig úgy, hogy az megfeleljen a természetes nappal-éjjel ciklusnak. Egy kisebb csoportban a világos ciklust négy órával meghosszabbítottuk a huszonnégy órás perióduson belül.

Amennyiben az állatok perfundálás útján történő feláldozására és az azt követő GFAP immunreakcióra nappal került sor, a nucleus suprachiasmaticus igen gyenge vagy negatív reakciót adott. Éjjel történő feldolgozás esetén azonban a reakció erősnek bizonyult, különösen a mag ventromediális részében. Ismét megállapíthattuk, hogy a fenti napi változásban a magot ellátó kapillárisokat körülvevő asztrocita nyúlványok nem vesznek részt,

amennyiben megvilágítástól és napszaktól függetlenül egyenletesen erős festést mutattak. Kasztráció a GFAP napi ingadozását ebben a magban nem befolyásolta. Ugyancsak nem tapasztaltunk változást a világos ciklus meghosszabbítása után.

Párhuzamosan vizsgált nőtények nucleus suprachiasmaticusában hasonló tendenciájú, de intenzitásában gyengébb változást észleltünk. Ovariectomia, vagy a világítási ciklus meghosszabbítása sem okozott szignifikáns változást.

Ezeket a vizsgálatokat 2003 novembere és 2004 márciusa között végeztük, ami azért érdemel feltétlenül említést, mert a 2004 nyarán kapott eredmények a korábbiakkal szöges ellentétben voltak. Most már csak intakt hím patkányokra koncentrálni arra a következtetésre jutottunk, hogy a télen észlelt GFAP immunreaktivitás a nucleus suprachiasmaticusban nyáron megfordul, azaz nappal erős, éjszaka pedig gyenge. Ennek a meglepő jelenségnek a megerősítéséhez meg kellett várnunk még egy szezonális ciklust. 2005 őszére megismételtük a vizsgálatokat, hasonló eredménnyel.

Eközben kvantitatív citológia és elektronmikroszkópos immuncitokémia segítségével sejt szinten elemeztük a változásokat. Megállapítottuk, hogy az erős GFAP reakció esetén, legyen az bármelyik periódusban, az asztrociták száma a nucleus suprachiasmaticusban változatlan, tehát nem a körülmények indukálta proliferáció következik be. Ezzel szemben igen jelentős nyúlvány növekedést és a fibrilláris anyag felszaporodását tudtuk kimutatni. Ezért bizonyítottuk, hogy esetünkben nem asztrocita proliferáció, hanem hipertrófia következett be.

A fenti, véleményünk szerint igen messzevezető észleletek, szemben a nucleus interpeduncularis-ban megfigyelttel, szexuálisan indifferensnek mutatkoztak. Ezért a pályázat utolsó évében áttértünk a fény-indukálta glia változások egy másik lehetséges célpontjára, a corpus geniculatum laterale-nak a vizsgálatára. Mint közzismert, ez a mag, de elsősorban ennek dorzális szubdivíziója (dorsal geniculate nucleus, DGL) a retinából jövő látópálya végződési helye, ahonnan a geniculocorticalis pálya vezeti tovább a látóingereket az agykérgi látómezőkbe. Több, mint egy évtizede elkészített agyi GFAP térképeinket felidézve, a corpus geniculatum laterale mindkét szubdivíziója (dorzális és ventrális) egyaránt negatívnak bizonyult. Természetesen nem lévén okunk másként cselekedni, az akkori vizsgálatokat kizárólag nappal végeztük, ám a mostani ismereteink birtokában indokoltnak látszott ezt éjszaka megismételni. Az éjszaka perfundált állatokban elvégzett GFAP immunfestés erős reakciót mutatott a corpus geniculatum laterale dorzális szubdivíziójában, szemben a nappal észlelt immunonegativitással. Ezzel ismét bizonyítékát kaptuk annak, hogy az asztroglia reakciója a neuronális plaszticitás – esetünkben a retinából befutó ingerlés

megléte vagy hiánya – nyomán alakul ki, következésképpen a GFAP festés indikátora a régió neuronjai aktivitási állapotának.

A pályázatban megfogalmazott kérdést annyiban válaszolhatjuk meg, hogy a nemi hormonok által kiváltott neuronális plaszticitás maga után vonja a régió asztrocitáinak a hipertrófiáját, ezen keresztül GFAP expressziójuk fokozódását. Ahol a nemi hormonoknak az idegsejtekre nincs hatásuk, ott a glia funkció-függő változásai nemileg indifferensek.

A pályázat során végzett vizsgálatok számos új kérdést is felvetettek, melyek további kutatások kiindulópontjai lehetnek.

## Összefoglalás

Kísérleteket végeztünk mindkét nembeli patkányokon annak kiderítésére, hogy az asztrociták reaktivitása mutat-e nemi különbségeket. A reaktivitás indikátoraként az asztrocita-specifikus fehérje, a GFAP (glial fibrillary acidic protein) fénymikroszkópos immunhisztokémiai kimutatását használtuk, kiegészítve elektronmikroszkópos, kvantitatív denzitometriás és biokémiai módszerekkel. Megállapítottuk, hogy az asztrociták az „endokrin agyon” kívüli agyterületen is reagálnak a nemi hormon-szint változásaira. A reakció iránya ellentétes volt hímben és nőstényben, amit az ösztrogén receptorok különböző előfordulásával hoztunk összefüggésbe. Feltételeztük, hogy az asztrocita reakció mögött a neuronok hormon hatásra bekövetkező plasztikus, elsősorban a szinapszisokat érintő változásai állnak. Ebből kiindulva fordultunk egy másik modell, a biológiai óra mechanizmus strukturái, és ezen keresztül az asztroglia aktivitásának fotoregulációja felé. Leírtunk egy jelentős éjjel-nappali aktivitás fluktuációt a rendszerben, mely ezenfelül még szezonális változásokat is mutatott. Ebben a mechanizmusban szexuális dimorfizmus nem volt észlelhető.

A pályázati munka keretében végzett vizsgálatokból arra következtettünk, hogy a nemi hormonok által kiváltott neuronális plaszticitás maga után vonja a régió asztrocitáinak a hipertrófiáját, ezen keresztül GFAP expressziójuk fokozódását. Ahol viszont a nemi hormonoknak az idegsejtekre nincs hatásuk, ott a glia funkció-függő változásai nemileg indifferensek. Kísérleteink alátámasztják korábbi álláspontunkat, hogy a GFAP immunreakció a szinaptikus aktivitás jelzőjeként is alkalmazható.

## Summary

Experiments were carried out in rats of either sex to demonstrate sexual differences in the reactivity of astrocytes. As an indicator of reactivity, the astrocyte specific glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity was used at the light microscopic level. Observations were completed with electron microscopy, quantitative densitometry and biochemistry. Astrocytes were found to react to alterations of sexual hormone levels also in areas outside the „endocrine brain“. The direction of change was opposite in males and females which was explained by the differential distribution of estrogen receptors. It was assumed that the astrocyte reaction was due to underlying neuronal plasticity affecting primarily synapses. This led us to investigate the structures in a further model, the structures of the biological clock mechanism and through this, to study the photosensitivity of astrocytes. We described significant circadian fluctuations which showed an additional seasonal cyclicality. In this latter mechanism no sexual dimorphism could be pointed out.

From the studies supported by this grant it emerged that hormone-induced neuronal plasticity triggers a hypertrophy of regional astrocytes, thereby the increase of their GFAP expression. On the other hand, where sex hormones have no effect on nerve cells the reaction of astroglia is sexually indifferent. Findings support our earlier view that GFAP immunoreactivity may be used as a marker of synaptic activity.